



①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

①⑫ Übersetzung der
europäischen Patentschrift

⑤① Int. Cl.⁸:
G 01 N 33/94

⑧⑦ EP 0 458 594 B1

①⑩ DE 691 20 472 T 2

②① Deutsches Aktenzeichen:	691 20 472.1
⑧⑥ Europäisches Aktenzeichen:	91 304 587.8
⑧⑥ Europäischer Anmeldetag:	21. 5. 91
⑧⑦ Erstveröffentlichung durch das EPA:	27. 11. 91
⑧⑦ Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA:	26. 6. 96
④⑦ Veröffentlichungstag im Patentblatt:	6. 2. 97

DE 691 20 472 T 2

③⑩ Unionspriorität: ③② ③③ ③①
22.05.90 JP 130406/90

⑦③ Patentinhaber:
Psychomedics Corp., Santa Monica, Calif., US

⑦④ Vertreter:
Glawe, Delfs, Moll & Partner, Patentanwälte, 80538
München

⑧④ Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL,
SE

⑦② Erfinder:
Baumgartner, Werner A., Malibu California 90265,
US

⑤④ Haaranalyse

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patentamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 691 20 472 T 2

Haaranalyse

Gebiet der Erfindung

Diese Erfindung betrifft ein verbessertes analytisches Verfahren, das das verhältnismäßig schnelle Aufschließen und die direkte Analyse von organischen Analyten bewirkt, wie z.B. gesetzwidriger Drogen, die im Haar oder anderen keratinisierten Strukturen, wie z.B. in Fingernägeln und Zehennägeln vorliegen, ohne die Struktur des Analyten zu beeinflussen oder nachteilige Auswirkungen auf biologische Analysensonden wie z. B. Antikörper- RNA/DNA- und Biorezeptorsonden zu haben. Der Analyt kann direkt durch Zugabe der Analytprobe direkt zu der den aufgeschlossenen Analyten enthaltenden Lösung analysiert werden, um sowohl die Identität des Analyten als auch die Menge und die Zeitspanne seiner Konsumierung durch eine Person zu bestimmen.

Hintergrund der Erfindung

In der Vergangenheit wurden Haaranalysetechniken zum Detektieren von Spurenmetallen entwickelt, die Aufschlüsse über den Ernährungszustand einer Person liefern sollten. Ein Einwand gegen die Verwendung dieser Techniken besteht in der Schwierigkeit, zwischen Spurenmetallen, die im Haar aus dem Blutstrom abgelagert wurden, und Metallen, die sich im

Haar durch äußeren Kontakt mit beispielsweise Wasser und kosmetischen Mitteln abgelagert haben, zu unterscheiden. Folglich werden diese Techniken von der medizinischen Fachwelt nicht als brauchbar zum Diagnostizieren von Ernährungsproblemen angesehen und wurden daher nicht als ausreichend genau zum Bestimmen der Menge eines durch eine Person konsumierten bestimmten Spurenmetalls angesehen.

Die bei früheren Haaranalysetechniken auftretenden Probleme führten dazu, daß man sich auf Urin- und Blutanalysetechniken zum Detektieren von auf dem Weg der Nahrungsaufnahme von einer Person eingenommenen Chemikalien, wie zum Beispiel gesetzwidrigen Drogen, Medikamenten und giftigen Chemikalien, verläßt. Von diesen Techniken ist jedoch auch bekannt, daß sie insofern Nachteile aufweisen, als die Dauer und Intensität der Verwendung oder des Ausgesetztseins nicht sicher bestimmt werden kann. Urin- und Blutanalysen können bestenfalls kurzfristige Angaben hinsichtlich auf dem Wege der Nahrungsaufnahme eingenommener Drogen oder Chemikalien, wie gesetzwidriger Drogen, liefern. Darüberhinaus gibt es weitere Probleme bei der Interpretation solcher Ergebnisse. Die Detektion einer kleinen Menge einer durch Nahrungsaufnahme eingenommenen Chemikalie im Urin könnte bedeuten, daß eine Person eine kleinere Menge der Droge oder Chemikalie vor sehr kurzer Zeit oder eine größere Menge vor mehreren Tagen durch Nahrungsaufnahme zu sich genommen hat. Daher kann chronischer Drogengebrauch ohne wiederholte Untersuchungen durch diese Verfahren nicht bestimmt werden.

In Reaktion auf die Probleme des Schaffens eines verlässlichen und genauen Verfahrens, das sowohl die Dauer als auch die Intensität der Verwendung gesetzwidriger Drogen, Medikamente, giftiger Chemikalien etc. messen würde, wurde in Arbeiten von Dr. Werner A. Baumgartner, wie in "Radioimmunoassay of Hair for Determining Opiate Abuse Histories", J.

Nucl Med 20:749-752 (1979) festgestellt, daß langfristige Angaben über das Ausgesetztsein zu Drogen durch die Analyse von Säugetierkörperhaaren erhalten werden können, da diese Substanzen innerhalb individueller Haarfasern während ihrer Synthese "gefangen" werden. In dieser Hinsicht hat sich gezeigt, daß Haar wie ein Cassettenrecorder wirken kann, d. h. Chronologie der zurückliegenden Belastungen kann durch Schnittanalyse von Haarproben ausgewertet werden. Es wurde festgestellt, daß Heroin, wenn es einmal im Blutstrom enthalten ist, seinen Weg ins Haar bei dessen Synthese findet.

1 So wurde in dieser Untersuchung entdeckt und durch nachfolgende Untersuchungen bestätigt, daß eine Anzahl von Chemikalien, so wie gesetzwidrige Drogen, Medikamente, giftige Chemikalien etc., im folgenden gemeinsam als "Analyt" bezeichnet, durch Haar bei dessen Synthese eingefangen werden und daß diese Substanzen im wesentlichen für die Dauer des Bestehens des Haars im Haar "eingeschlossen" sind. Dies wurde sowohl für Kopf- und Körperhaar, als auch für andere keratinisierte Strukturen wie Fingernägel als zutreffend befunden. Suzuki et al., Forensic Sci. International, 24:9-16, 1984. Diese eingelagerten Substanzen können aus dem Haar nicht ausgewaschen werden und werden nur bei vollständiger Zerstörung der Haarfaser freigegeben.

Zu den bekannten Verfahren zum Extrahieren eines Analyten aus Haar gehörte es, das Haar heißen Methanollösungen auszusetzen (Baumgartner et al., J. Nucl Med 20, 748, 1979) oder Haar über Nacht in einem Alkali- oder Säuremedium zu inkubieren. D. Valente, et al., Clinical Chemistry, 1952, Bd. 27, Nr. 11, 1981. Frühere Verfahren schließen auch die Verwendung eines Mörsers und Stößels zum Freigeben des eingeschlossenen Analyten in Verbindung mit einem Lösungsmittel ein.

Die Lösungsmittel-Extraktionsverfahren leiden jedoch unter mehreren Problemen beim genauen Bestimmen des Vorliegens und der Menge eines auf dem Weg der Nahrungsaufnahme eingenommenen Analyts. Eines dieser Probleme besteht darin, daß die Lösungsmittel-Extraktionsverfahren oft nur einen kleinen, unbekannten und veränderlichen Teil des gesamten in der Haarprobe vorliegenden Analyten entfernen. Solche Verfahren neigen auch dazu, zeitaufwendig zu sein und benötigen allgemein erhöhte Temperaturen, die den Analyten beschädigen können. Ein weiterer Nachteil besteht darin, daß verschiedene Analyten zur Extraktion unterschiedliche Lösungsmittel benötigen. Zum Beispiel muß eine Morphinum, Phenylcyclidin ("PCP"), Kokain und Marihuana enthaltende Haarprobe nacheinander mit mehreren verschiedenen Lösungsmitteln extrahiert werden, was ein sehr zeitaufwendiges Verfahren darstellt, insbesondere da die Lösungsmittel verdampft werden müssen, bevor die Analyse durchgeführt werden kann. Andere Verfahren und Untersuchungen, die die Zersetzung von Haar und Haaranalyse betreffen, umfassen:

O. Suzuki, et al., offenbart in einer Veröffentlichung von Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd. ein Verfahren zum Detektieren von Methamphetamin und Amphetamin in Fingernagelabschnitten oder Haar, bei dem die Substanz zuerst in einer Mischung aus Methanol und Wasser gewaschen und in Natriumhydroxid aufgelöst wurde, gefolgt von der Analyse der extrahierten Droge.

A. W. Holmes offenbart im Textile Research Journal, 706-712, August 1964, die Zersetzung von menschlichem Haar durch Papain unter Verwendung von Natriumsulfit als Enzymaktivator.

Anette M. Baumgartner, et al., offenbart im Journal of Nuclear Medicine, 20:748-752, 1979, die Extraktion von Morphinum und Heroin aus Haar durch Pulverisieren von Haar mit

einem Mörser und Stößel gefolgt von einer Behandlung mit Methanol.

D. Valente, et al., offenbart in Clinical Chemistry, Vol. 27, Nr. 11, 1981 sowohl Dr. Baumgartner's Verfahren einer Behandlung von Haar mit heißem Methanol, um die Extraktion von gesetzwidrigen Drogen zu bewirken, als auch das Verfahren des Autors, bei dem Morphin in einem Säure- oder Alkalimedium extrahiert wird.

A. M. Baumgartner, et al., offenbart im Journal of Forensic Sciences, S. 576-81, Juli 1981, die Extraktion von PCP mit Mörser und Stößel gefolgt von einer Behandlung mit Methanol. Das extrahierte PCP wurde anschließend durch RIA analysiert.

Smith et al., offenbart im Journal of Forensic Sciences, Bd. 26, Nr. 3, Juli 1981, S. 582-586 das Untersuchen von Haar hinsichtlich des Vorliegens von Phenobarbital, wobei ein einzelnes Kopfhair gewaschen, getrocknet, in 2 mm Längen geschnitten wurde und 0,2 ml 0,1%-tiger SDS (sodium dodecyl sulfate - Natriumlaurylsulfat)/Kochsalzlösung hinzugegeben wurde und eine Probe durch Radioimmunassay (RIA) untersucht wurde.

W. A. Baumgartner, Black, et al., offenbart in J. Nucl Med 23: 790-892, 1982, die Extraktion von Kokain aus Haarproben durch Refluxieren der Haarproben in Ethanol gefolgt von RIA-Analyse.

Ishiyama, et al., offenbart im Journal of Forensic Sciences, Bd. 28 Nr. 2, April 1983, S. 380-385 ein Verfahren, durch das Haar von Methamphetamin-Abhängigen durch Verwendung von 1,5 N Salzsäure bei einem pH-Wert zwischen 1 und 2 aufgelöst wurde, gefolgt von Analyse unter Verwendung eines Gaschromatographs und Massenspektrometrie.

K. Puschel, et al., offenbart in Forensic Science International, 21 (1983) 181-186, das Auflösen von Haarproben, indem dieselben Natriumhydroxid und Wärme ausgesetzt werden, gefolgt durch Analyse hinsichtlich des Vorliegens von Morphin durch RIA.

O. Suzuki, et al., offenbart im Journal of Forensic Sciences, Bd. 29, Nr. 2, April 1984, S. 611-617 die Detektion von Methamphetamin und Amphetamin in einem einzelnen menschlichen Haar durch Gaschromatographie und chemische Ionisations-Massenspektrometrie. Die Haarprobe wurde zuerst in einer Natriumhydroxidlösung aufgelöst, zu der N-Methylbenzylamin hinzugegeben wurde.

N. J. Haley et al., offenbart in Clin. Chem. 31/10, 1598-1600 (1985), die Analyse von Haar hinsichtlich Nikotin und Cotinin, bei der gewaschene Haarproben in einer Gelatin, Natriumchlorid, Tris und EDTA enthaltenden Pufferlösung aufgelöst und auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt wurden. Die Proben wurden anschließend durch Radioimmunassay analysiert.

Sramek, Baumgartner, et al., offenbart in A.M.J. Psychiatry 142:8, August 1985, die Analyse von Haarproben psychiatrischer Patienten mit Methanolextraktion und Radioimmunassay.

Baumgartner, et al., offenbart in Clinical Nuclear Medicine, Bd. 10, September 1985, die Vorzüge des Extrahierens von eingeschlossenen gesetzwidrigen Drogen aus Haar gefolgt von RIA-Analyse.

Gill, et al., offenbart in Nature, Bd. 318, S. 577 (1985) die Verwendung einer SDS/Proteinase-K/Dithiothreitol-Mischung zum Extrahieren von DNA aus Vollblut, Vollsamen, Vaginalflüssigkeit, Haarwurzeln, Blutflecken und Samenflek-

ken. In dem Artikel wird festgestellt, daß "keine DNA aus Haarstielen isoliert werden könne".

Smith et al., offenbart in J. Forensic Sci. 1986, 31(4), 1269-73, die Detektion von Kokain in Schweiß, Menstruationsblutflecken und Haar unter Verwendung von RIA.

M. Margio, et al., offenbart in "Determination of Morphine and other Opioids in the Hair of Heroin Addicts by HPLC and MS/MS" bei der Internationalen Konferenz, Universität von Verona, Juni 25-26, 1986, verschiedene Verfahren zum Untersuchen von Morphinium aus Haarproben.

M. Margio, et al., offenbart im Journal of Analytical Toxicology, Bd. 10, Juli/August 1986, ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von in dem Haar von Heroinabhängigen enthaltenem Morphinium mittels Wärme-Säurehydrolyse, Vorsäulen-Dansyl-Derivatisierung, Reinphasen-Flüssigkeitschromatographie und Fluoreszenzdetektion.

Smith, et al., offenbart im Journal of Forensic Sciences, Bd. 31, Nr. 4, Oktober 1986, S. 1269-1273, ein Verfahren zur Analyse von Haar hinsichtlich des Vorliegens von Drogen, bei dem Haarproben zuerst gewaschen, in kleine Segmente geschnitten, sechs Minuten lang mechanisch pulverisiert, in Ethanol refluxiert wurden und die Proben durch Verwendung von Radioimmunassay analysiert wurden.

M. Michalodinitrakis, Med.Sci.Law (1987), Bd. 27, Nr. 1, offenbart die Detektion von Kokain in Ratten aus der Analyse von Haarproben, die aufgelöst wurden, indem sie 1,5 N HCL ausgesetzt wurden, was den pH-Wert auf 1-2 brachte, gefolgt von der Inkubation mit 0,01 N HCL bei 37°C für eine Stunde.

Pelli, et al. offenbart in Biomedical and Environmental Mass Spectrometry, Bd. 14, 63-68 (1987), ein Verfahren zur Identifizierung von Morphinum im Haar von Heroinabhängigen, bei der Haar mit Diethylether und Salzsäure behandelt wird, gefolgt von der Auflösung des getrockneten Extrakts in Methanol.

Higuchi et al., offenbart in Nature, Bd. 332, S. 543 (1988) ein Verfahren zum Auflösen von Haar bei einem pH-Wert von 8 durch die Wirkung von Dithiothreitol, Proteinase K und 2%-tigen Natriumlaurylsulfat, um DNA aus dem Abbau durch ein komplexes chemisches Extraktionsverfahren zu extrahieren.

Ferner ist auf bestehende Patente hinzuweisen, z.B. US-Patente Nr. 3,986,926, 3,966,551, 3,939,040 und 3,632,950, die Enthaarungsmittel zum Gerben von Tierhäuten betreffen und die Verwendung bestimmter Enzyme, u.a. Papain, in dem Enthaarungsprozess offenbaren.

Diese und andere bekannte Verfahren haben sich jedoch aus den oben aufgeführten Gründen und/oder deshalb als nachteilhaft herausgestellt, da sie die Analytsonden (z. B. Antikörper) biologischer analytischer Verfahren zersetzen, wodurch die Verwendung solcher hoch empfindlicher analytischen Techniken nicht möglich ist.

Es besteht daher ein Bedarf an einem Analyt-Detektionsverfahren, das schnell und vollständig einen bestimmten Analyten aus keratinisierten Strukturen des Körpers wie Haar, Fingernägeln, Zehennägeln und Haut einer Person aufschließen kann und das eine direkte Analyse der Identität des Analyten und der Verwendungsdauer des Analyten in einer Person oder des Ausgesetztseins einer Person zu demselben ermöglicht, ohne den betreffenden Analyten und/oder eine Analytsonde von biologisch analytischen Verfahren zu zerstören.

Zusammenfassung der Erfindung

Eine Aufgabe der Erfindung besteht in der Schaffung eines Verfahrens zur Detektion von Drogen und chemische Substanzen.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht in der Schaffung eines Verfahrens zur Haaranalyse auf Drogen und chemische Substanzen.

1 Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht in der Schaffung eines verlässlichen Verfahrens zum Aufschließen und direkten Analysieren der Identität von Analyten in Kopf- und Körperhaar und anderen keratinisierten Strukturen des Körpers und, wo anwendbar, zum Bestimmen der Dauer und der Menge der Belastung einer Person mit dem Analyten.

Noch eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht in der Schaffung eines Haaranalyseverfahrens, das einen Analyten aus dem Innenkern von Haar aufschließt, ohne den Analyten zu beschädigen;

Noch eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht in der Schaffung eines Verfahrens zum verlässlichen Haaraufschließen und zur direkten Analytdetektion, das wirkungsvoll den Gebrauch hochgenauer biologischer analytischer Verfahren zuläßt;

Noch eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht in der Schaffung eines verlässlichen Haaranalyseverfahrens, das in einer wesentlich kürzeren Zeitspanne als bekannte Haaranalyseverfahren durchgeführt werden kann.

Diese und andere Aufgaben werden durch ein neues Verfahren zur Analyse keratinisierter Strukturen gelöst, das umfaßt:

Herstellen einer Mischung, die eine Verbindung mit niedrigem Redoxpotential wie Dithiothreitol (DTT) oder Dithioerythritol (DTE), ein für das Auflösen von keratinisierten Strukturen geeignetes Enzym und eine Probe einer keratinisierten Struktur enthält; Aktivierenlassen der keratinisierten Struktur und/oder des Enzyms durch das DTT oder DTE; mindestens weitgehendes Auflösen der Probe der keratinisierten Struktur durch das Enzym, um eine Keratinabbaulösung zu bilden; und Analysieren eines Teils der Keratinabbaulösung, um die Identität und Menge des Analyten, wenn vorhanden, in der keratinisierten Strukturprobe zu detektieren.

Die bevorzugte keratinisierte Struktur ist Haar. Das Enzym kann aus der aus Peptidase, Endopeptidase und Protease bestehenden Gruppe ausgewählt werden und ist vorzugsweise Pappain, Chymopapain oder Proteinase K. Zur Beschleunigung des analytischen Prozesses kann Kupfer(II)-sulfat- oder Natriumarsenit (NaAsO_2) zu der Abbaulösung hinzugegeben werden, um störendes überschüssiges Dithiothreitol oder Dithioerythritol in der Mischung zu deaktivieren. Vorzugsweise wird die Analyse des aufgeschlossenen Analyten durch ein biologisches analytisches Verfahren wie ein Immunassay durchgeführt.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

In Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren geschaffen, das das schnelle und vollständige Aufschließen eines bestimmten Analyten aus Kopf- oder Körperhaar oder anderen keratinisierten Strukturen einer Person zulässt, die vorher dem Analyten ausgesetzt war, z.B. den Analyten auf dem Wege der Nahrungsaufnahme zu sich genommen hat, gefolgt von der Identifizierung des Analyten durch bekannte analytische biologische Untersuchungen, wie die schnellen und sehr empfindlichen Immunassays. Das Auf-

schließen des Analyten aus dem Inneren von Haar wird durchgeführt, ohne weder den in der organischen Matrix der zu analysierenden Haarfaser eingeschlossenen Analyten zu beschädigen, noch eine anschließend verwendete Sonde (z. B. Antikörper) eines biologischen analytischen Verfahrens zu beeinflussen. Das erfindungsgemäße Haaranalyseverfahren ermöglicht weiter die Detektion der Chronologie des zurückliegenden Drogengebrauchs einer Person über längere Zeitspannen, ohne wiederholte Untersuchungen durchführen zu müssen, wie es bei herkömmlichen Analytdetektionsverfahren erforderlich ist, bei denen der Gehalt des Analyten in Blut- oder Urinproben gemessen wird.

Im einzelnen umfaßt die Erfindung den schnellen enzymatischen Abbau der Proteine, die Proben von Haar und anderen keratinisierten Strukturen bilden, gefolgt von der wirksamen Deaktivierung des Enzyms und des verbundenen Enzym-/Substrataktivators (DTT und DTE). Der resultierende aufgeschlossene Analyt in der Haarabbaulösung kann anschließend durch bekannte biologische analytische Untersuchungen, vorzugsweise durch sehr empfindliche, auf Proteinen basierende analytische Techniken, wie Immunassay, analysiert werden. Es wurde festgestellt, daß die Menge des im Haar eingeschlossenen Analyten direkt proportional zu der Menge des auf dem Weg der Nahrungsaufnahme eingenommenen Analyten ist.

In Übereinstimmung mit der Erfindung wird eine Probe einer keratinisierten Struktur, z.B. Haar, zuerst einer Person entnommen, die unter dem Verdacht steht, einem bestimmten Analyten ausgesetzt gewesen zu sein oder denselben auf dem Weg der Nahrungsaufnahme eingenommen zu haben. Vorzugsweise wird die Haarprobe zuerst durch bekannte Verfahren gewaschen, um jeglichen Analyt oder jegliche andere Droge oder Chemikalie zu entfernen, die auf der Oberfläche des Haars eher durch äußeren Kontakt als durch tatsächliche Konsumie-

1
rung aufgebracht worden sein kann. Die Haarprobe wird dann mit bestimmten Enzymen zusammen mit einem bestimmten Enzym-/Substrataktivator so behandelt, daß die vollständige oder beinahe vollständige Auflösung der organischen Matrix der Haarfaser, bekannt als Keratin, bewirkt wird. Der betreffende Analyt, der innerhalb der organischen Matrix des Haar "eingefangen" ist, wird anschließend in eine Lösung freigesetzt, oder selbst wenn der Analyt proteingebunden ist, ist er dem in auf Proteinen basierenden analytischen Verfahren verwendeten Antikörper zugänglich. Um das erfindungsgemäße Verfahren vollständig und genau durchzuführen, ist eine vollständige Auflösung der keratinisierten Struktur erwünscht.

Die für die Auflösung der Haarproben bevorzugten Enzyme sind diejenigen aus den Enzymklassen Peptidase, Endopeptidase und Protease. Am aktivsten und daher zur Verwendung in der Erfindung bevorzugt, sind die Enzyme Papain, Chymopain und Proteinase K.

Es wurde festgestellt, daß eine Anzahl anderer Proteasen bei niedrigen pH-Werten (z. B. pH 7-9) in dem erfindungsgemäßen Verfahren wirksam sind, nämlich Typ IV (bakteriell, von *Streptomyces caespitosus*), Typ VIII (von *Bacillus subtilis*), Typ XI (Proteinase K, aus fungus, von *Tirtrachium album*), Typ XIV (Pronase, von *Streptomyces griseus*), Typ XVI (von *Bacillus subtilis*), Typ XVIII (Newlase, von *Rhizopus* Spezies), Typ XIX (von *Aspergillus sojae*), Typ XXI (von *Streptomyces griseus*), Typ XXIV (bakteriell), Typ XXVII (Nagarase), Typ III (Prolase), Typ X (thermophile bakterielle Protease, Thermolysin); und Typ XXIII (von *Aspergillus Oryzae*).

Wie oben festgestellt, umfassen bestimmte, im Stand der Technik bekannte Verfahren die Verwendung von Papain als ein Enthaarungsmittel. Diese Enthaarungsverfahren entfernen

1 Haar von Fellen und Haut durch ausreichendes Erweichen derselben, um so seine leichte Entfernung durch Abschaben oder andere mechanische Mittel zu ermöglichen, und verwenden preisgünstige und weniger wirksame Sulfhydryl-Enzym- und Substrataktivatoren wie beispielsweise Thioglycolsäure oder Zystein. Daher zersetzen diese Verfahren das Haar nur teilweise und sorgen nicht für eine vollständige chemische Auflösung des Haars. Ein bloßes Aufweichen des Haars wäre in einem Verfahren zur Analyse von Haar zum Detektieren eines Analyten nicht geeignet, da nur eine vollständige oder beinahe vollständige Auflösung von Haar geeignet ist, um eine vollständige Freigabe eines "eingefangenen" Analyten zu erhalten. Darüberhinaus sind die in diesen Enthaarungsverfahren verwendeten Sulfhydryl-Enzymaktivatoren weiter für bestimmte biologische Analytsonden, wie Antikörper, schädlich.

Im Gegensatz zu diesen Enthaarungsverfahren verwendet das erfindungsgemäße Verfahren Dithiothreitol ("DTT", oder 2,3-Dihydroxybutan-1,4-Dithiol) oder sein Isomer Dithioerythritol ("DTE" oder 2,3-Dihydroxybutan-1,4-Dithiol) als das Substrat und Sulfhydryl-Enzym aktivierende Mittel. Überraschenderweise wurde festgestellt, daß DTT und DTE ein hoch aktives Enzym erzeugen, das Haar innerhalb einer verhältnismäßig kurzen Zeitspanne, z. B. etwa drei Stunden, auflösen kann, was zur Freisetzung des Analyten in die Haarabbaulösung führt. Es wurde festgestellt, daß diese hohe Aktivität des Enzyms zumindest teilweise auf der Aktivierung des Substrats mit keratinisierter Struktur selbst durch DTT und DTE beruht, vermutlich durch die Wirkung von DTT und DTE beim Öffnen von Disulfidbindungen in der keratinisierten Struktur, was den enzymatischen Angriff vereinfacht.

Nachdem das Protein der keratinisierten Struktur vollständig oder zumindest im wesentlichen aufgelöst worden ist,

wodurch der Analyt in die Lösungsmischung freigegeben wurde, wurde es als notwendig erkannt, das Enzym und die Enzym-/Substrataktivatoren zu deaktivieren, um den Analyt biologischen analytischen Sonden, wie Antikörpern, auszusetzen, da die Enzyme und Enzym-/Substrataktivatoren, wie oben festgestellt, die strukturelle Integrität von an dem analytischen Verfahren beteiligten Proteinsubstanzen beeinträchtigen können.

Die Aufgabe, die Sulfhydryl-abhängigen Enzyme wie Papain zu deaktivieren, hat sich als schwierig herausgestellt, da nach dem Enthaarungsschritt die Enzyme in einem "Meer" von Sulfhydrylgruppen "begraben" sind, die zu den freigesetzten Haarproteinen und den Enzym/Substrat aktivierenden Mitteln gehören. Bekannte Sulfhydryl-Blockierungsmittel sind beim Deaktivieren der Enzyme wirkungslos, da die bekannten Sulfhydryl-Blockierungsmittel dazu neigen, sich an die zersetzten Haarproteine und DTT oder DTE und nicht unbedingt an die Enzymsulfhydrylstellen, die entscheidend für das Blockieren der Aktivität der Enzyme sind, zu binden. Es ist daher nicht möglich, die auf Proteinen basierenden analytischen Verfahren wirksam zu verwenden, wenn die Enzymsulfhydrylstellen noch aktiv sind.

Es wurde daher überraschenderweise festgestellt, daß DTT und DTE nicht nur zum Aktivieren von Enzymen und/oder der Substrate mit keratinisierten Strukturen wirken, wobei eine unerwartet hohe Haarabbauaktivität bewirkt wird, sondern daß sie auch spontan wirken, um die Enzyme durch einen direkten oder indirekten (Selbst-Deaktivierung von Enzymen) Mechanismus zu deaktivieren, nachdem das Enzym die vollständige oder beinahe vollständige Auflösung des Haarproteins bewirkt hat. Typischerweise tritt die Enzym-Deaktivierungswirkung von DTT oder DTE innerhalb etwa vier bis fünf Stunden, nachdem es dem Enzym ausgesetzt wurde, auf, was eine ausreichende Zeitspanne für das Enzym darstellt, die

Auflösung der Haarprobe zu bewirken. Nachdem das Enzym deaktiviert wurde, wurde festgestellt, daß das Enzym nicht reaktiviert oder regeneriert werden kann, wenn es frischem DTT oder DTE ausgesetzt wird.

Eine Deaktivierung von zumindest bestimmten der Sulfhydryl-unabhängigen Proteinasen, z. B. Proteinase K, durch sein Inhibierungsmittel, Phenylmethylsulfonylchlorid, ist allgemein nicht erforderlich, da festgestellt wurde, daß das Enzym nicht gegen die in auf Proteinen basierenden Immunsayverfahren verwendeten Antikörper aktiv ist.

1 Es wurde weiter festgestellt, daß in der Haarabbau-
lösung vorhandenes DTT und DTE eine Gefahr für die Struktur und
die Aktivität anderer Proteine bildet, denen es ausgesetzt
wird, z. B. in Radioimmunsay verwendeten Antikörpern. Ein
weiteres überraschendes Ergebnis war daher, daß DTT oder
DTE in der Reaktionsmischung nicht spontan zur Deaktivie-
rung des Enzyms wirken wird, sondern in der Abbau-
lösung selbst spontan deaktiviert wird. Typischerweise wird die
spontane Deaktivierung von DTT oder DTE etwa 14 Stunden
nach seinem ersten Kontakt mit dem Enzym auftreten, abhän-
gig von den verschiedenen Konzentrationen und Mengen des
verwendeten Enzyms und des verwendeten DTT oder DTE, dem
pH-Wert, der Temperatur, der Menge der Haarprobe etc.

Daher kann in Übereinstimmung mit dem erfindungsgemäßen
Verfahren ein vollständiger Haarabbau in einer verhältnis-
mäßig kurzen Zeitspanne, z. B. über Nacht, durchgeführt
werden und die Haarabbau-
lösung, die den betreffenden Analy-
ten einschließt, kann direkt wirkungsvoll und akkurat am
nächsten Morgen durch auf Proteinen basierende Liganden-
say-Analyseverfahren analysiert werden.

Typischerweise sollte das gesamte Verfahren, vom Waschen
der Haarproben bis zur Identifizierung des Analyten, nicht

länger als 16-20 Stunden dauern. Nachdem das Enzym und DTT oder DTE mit der Haarprobe in Kontakt gekommen sind, ist nur geringfügige oder keine Intervention durch die das Verfahren durchführende Person zum Freisetzen des Analyten aus der Haarprobe erforderlich.

Alternativ wurde entdeckt, daß die Zugabe von Kupfer(II)-sulfat zu der an Sulfhydrylgruppen reichen Haarabbau-
lösung zur schnelleren Deaktivierung der Sulfhydrylgruppen von DTT oder DTE wirkt. So verkürzt die Zugabe kleiner Mengen des Kupfer(II)-sulfats zu der Haarabbau-
mischung nach Abbau der Haarprobe und der Deaktivierung des Enzyms durch DTT oder DTE bedeutend die Zeit, in der die Haarabbau-
mischung dem Analyseverfahren unterzogen werden kann, da es nicht notwendig ist, auf die Selbst-Deaktivierung von DTT oder DTE zu warten, die etwa vierzehn Stunden nach seiner Zugabe zu der Lösung erfolgt. Typischerweise werden etwa 100 Mikroliter Kupfer(II)-sulfat (10 mg/ml) zu 1 ml Haarabbau-
mischung etwa 4 bis 5 Stunden, nachdem das Enzym und DTT oder DTE mit der Haarprobe in Kontakt gebracht wurde, hinzugegeben, um so dem Enzym eine ausreichende Zeit zum Auflösen der Haarprobe zuzugestehen.

In ähnlicher Weise kann Natriumarsenit (NaAsO_2) in der Erfindung verwendet werden, um Rest-DTT oder -DTE durch Bildung einer auszufällenden Verbindung zu entfernen. Typischerweise werden 100 Mikroliter einer 100 mg/ml Lösung Natriumarsenit zu 1 ml Haarabbau-
lösung hinzugegeben, um die Deaktivierung von DTT und DTE zu bewirken.

Nachdem die schnelle und effektive Auflösung von Haar zum Freigeben eingeschlossener Analyten wie oben beschrieben durchgeführt worden ist, kann die Analytmischung anschließend direkt durch im Stand der Technik bekannte, auf Proteinen basierende analytische Verfahren, wie Radioimmun-

assay ("RIA"), analysiert werden. Solche Verfahren sind zur Verwendung in der Erfindung bevorzugt, da RIA und verwandte Immun- oder Ligandenassays derzeit die einzigen bekannten Massenproduktionsverfahren sind, die die erforderliche Empfindlichkeit und Bequemlichkeit zum Messen der niedrigen Konzentrationen von in Haarproben enthaltenen Analyten aufweisen. Die Verwendung dieser Verfahren ist bevorzugt, da nur etwa 0,5 bis 1,0 mg Haar für die Analyse durch RIA und andere, auf Proteinen basierende analytische Verfahren benötigt wird. Es wurde für bestimmte gesetzwidrige Drogen tatsächlich festgestellt, daß Analyse durch das erfindungsgemäße Verfahren wirksam auf der Grundlage von so wenig wie ein oder zwei Haaren mit einer Länge von etwa einem Zoll durchgeführt werden kann.

Es wurde festgestellt, daß das erfindungsgemäße Verfahren wirksam beim Detektieren des Gebrauchs und früheren Gebrauchs gesetzwidriger Drogen wie Kokain, Morphin/Heroin, Marijuana, Phenylcyclidin oder "PCP" und Methaqualon ist. Darüberhinaus wurde festgestellt, daß das erfindungsgemäße Verfahren wirkungsvoll beim Bestimmen eines früheren Gebrauchs von Rezeptdrogen wie Digoxin und Amphetaminen und giftigen Chemikalien wie Nikotin ist. Es ist beabsichtigt, daß ein jeglicher, im Blutstrom einer Person vorhandener und auf das Haar übertragener organischer Analyt während seiner Synthese extrahiert und nach mit dem erfindungsgemäßen Verfahren analysiert werden kann.

Beim Durchführen des erfindungsgemäßen Verfahrens wird vorzugsweise eine wässrige Lösung von etwa 110 mg DTT oder DTE/10 ml Wasser verwendet, obwohl gezeigt wurde, daß auch DTT- oder DTE-Konzentrationen von etwa 50-200 mg/10 ml im Rahmen der Erfindung wirksam sind. Es ist bevorzugt, daß das Gewichtsverhältnis von DTT oder DTE zu Papain oder Chymopapain etwa 110:2 beträgt (wenn die Enzymreinheit 16-40 BAEE-Einheiten/mg Protein ist), obwohl wirksame Ergebnisse

bei Gewichtsverhältnissen von DTT oder DTE zu Papain oder Chymopapain im Bereich zwischen etwa 110:1 bis etwa 110:4 beobachtet wurden. Hinsichtlich Proteinase K und anderer Proteasen ist es bevorzugt, daß das Gewichtsverhältnis von DTT oder DTE zu Proteinase K (oder anderen Proteasen) etwa 1200:1 ist (wenn die Enzymreinheit 10-20 Einheiten pro mg Protein ist), obwohl Gewichtsverhältnisse von 1200:0,5 bis etwa 1200:2 auch wirksam sind.

Die Konzentration von Haarprotein wird vorzugsweise konstant bei etwa 10 mg Haar/cm³ Abbaulösung gehalten, um unterschiedliche Matrixeffekte in einem anschließend verwendeten, auf Proteinen basierenden analytischen Verfahren zu verhindern.

Es ist bevorzugt, daß der enzymatische Abbau von Haar in Übereinstimmung mit dem erfindungsgemäßen Verfahren bei niedrigen Temperaturen und nahe einem neutralen pH-Wert durchgeführt wird. Es ist in dieser Hinsicht bevorzugt, das Verfahren, wenn Papain oder Chymopapain als das Enzym verwendet wird, bei einer Temperatur zwischen etwa 20°C und 40°C und bei einem pH-Wert zwischen etwa pH 8,8 und 10,5 durchzuführen. Der pH-Wert beträgt vorzugsweise zwischen etwa 8,8 und 9,5. In einer am meisten bevorzugten Ausführungsform beträgt die Temperatur etwa 37°C und der pH-Wert etwa 9,1.

Wenn Proteinase K oder andere Proteasen als das Enzym verwendet werden, ist es bevorzugt, das Verfahren zwischen etwa 20 und 40 Grad Celcius und bei einem pH-Wert zwischen 7 und 9 durchzuführen. Bei der am meisten bevorzugten Ausführungsform beträgt die Temperatur etwa 37 Grad Celcius und der pH-Wert etwa 7,0; unter diesen Bedingungen ist das Risiko der Beschädigung eines bestimmten Analyten minimal. Andere Enzyme, die Haar unter neutralen Bedingungen auflösen, umfassen: Protease Typ XIV (Pronase), Typ IV,

Typ VIII, Typ XXVII (Nagarase), Typ XXVIII (Newlase),
Typ XXVIII, Typ XVI, Typ XXI und Typ XXIII.

Im Gegensatz zu anderen verfügbaren Analytdetektionsverfahren, wie Urin- und Blutanalysen, ermöglicht das erfindungsgemäße Verfahren die Detektion der über einen Zeitraum andauernden Aufnahme eines Analyten und ist aus diesem Grunde sehr vorteilhaft beim Detektieren von chronischem Drogengebrauch. Da bekannt ist, daß Haar mit einer Geschwindigkeit von etwa 0,3-0,4 mm/Tag oder etwa 1,0-1,3 cm/Monat wächst, ist es möglich, Konsumierung oder Zufuhr solange zurückzuverfolgen, wie es die Haarlänge zuläßt, indem Abschnitte des Haars verschiedener Längen ausgewertet werden, und die Verwendung hoch empfindlicher, auf Proteinen basierender analytischer Verfahren ermöglicht eine Analyse kleiner, in den kurzen Haarabschnitten enthaltener Analytproben.

Durch Schnittanalyse schafft das erfindungsgemäße Verfahren eine verhältnismäßig permanente Aufzeichnung und permanente Beweise eines Musters eines Drogengebrauchs oder der früheren Einnahme anderer Substanzen für Zeitspannen im Bereich von mehreren Tagen bis Monaten oder sogar Jahren nach der letzten Verwendung. Die Entwicklung einer solchen Zufuhr kann so ausführlich wie gewünscht ausgeführt werden, indem geeignet kurze Haarabschnitte analysiert werden, die verschiedene Wachstumszeiträume darstellen. Auf diese Weise kann ein früherer Gebrauch über eine Zeitspanne und der Umfang eines solchen Gebrauchs bestimmt werden.

Obwohl die Verwendung von Kopfhhaar zur Verwendung in der Erfindung aufgrund seiner Länge und Zugänglichkeit bevorzugt ist, ist es möglich, jegliches anderes Körperhaar in dem erfindungsgemäßen Verfahren zu verwenden. Es ist auf diese Weise praktisch nicht möglich, eine Untersuchung nach dem erfindungsgemäßen Verfahren durch Rasieren des Kopfes zu vermeiden.

Behandlungen wie Dauerwelle und Färben können jedoch die Auflösungsgeschwindigkeit von dem erfindungsgemäßen Verfahren ausgesetztem Haar erhöhen. In einigen Fällen kann ein Analyt vor der Durchführung des Verfahrens aufgrund solcher Behandlungen verloren gehen. Wenn das Haar der Person so verändert wurde, ist eine Erhöhung der Abbaugeschwindigkeit offensichtlich und ein geeigneter Korrekturfaktor kann auf der Grundlage bekannter Geschwindigkeiten von normalem Haarabbau angewendet werden.

Bestimmte andere kosmetische Mittel, wie bestimmte Entspannungsmittel, können bewirken, daß Haar gegen Abbau resistent wird. Eine solche Resistenz kann durch Erhöhen der Menge des zu verwendenden Enzyms überwunden werden. Vorzugsweise wird Proteinase K als das Enzym verwendet, wenn man auf eine solche Abbauresistenz trifft.

Wenn die Verwendung von Körperhaar nicht möglich ist oder wenn in einigen Fällen die Verwendung von Haar nicht erwünscht ist, kann die Verwendung von keratinisiertem Gewebe, wie beispielsweise Fingernägeln, Zehennägeln und Haut, im Rahmen der Erfindung verwendet werden. In dieser Hinsicht ist das wirksame Verhältnis von DTT oder DTE zu dem Enzym, das zum Auflösen von Fingernägeln und Zehennägeln zum Freigeben des Analyten benötigt wird, etwa das gleiche, wie das für die oben erörterte Verwendung mit Haar benötigte. Nachdem Fingernagel- oder Zehennagelproben in Übereinstimmung mit dem hier beschriebenen Verfahren aufgelöst worden sind, kann der freigesetzte Analyt durch ein gewünschtes analytisches Verfahren analysiert werden.

Gemäß einem anderen Aspekt der Erfindung wurde überraschenderweise entdeckt, daß im Haar enthaltene Melaninkörnchen durch die kombinierte Wirkung des Enzyms (vorzugsweise Papain), DTT oder DTE und Ethylendiamin-Tetraessigsäure

(EDTA), das letztere bei einer Konzentration von etwa 5 mg EDTA/ml Abbaulösung, aufgelöst werden können. Da entdeckt wurde, daß bestimmte Analyten oder gesetzwidrige Drogen, wie beispielsweise PCP, sich in diesen Körnchen sammeln, kann eine Auflösung der Körnchen, die in der Abbaulösung von Haar vorhanden sind, durchgeführt werden und der in dem Körnchen enthaltene Analyt kann identifiziert werden.

Gemäß diesem Aspekt der Erfindung wird eine Haarabbaulösung wie oben beschrieben gewonnen, und die Melaninkörnchen werden aus der Haarabbaulösung, z.B. durch Zentrifugierung, entnommen. Die Melaninkörnchen werden dann mit EDTA, dem Enzym und DTT oder DTE in Kontakt gebracht, um den Analyten aus den Melaninkörnchen freizusetzen und der Analyt wird durch die oben beschriebenen Verfahren analysiert.

Die sich aus der Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens ergebenden Vorteile sind zahlreich. Das Verfahren schafft eine prompte und exakte Diagnose darüber, ob eine Person früher einem bestimmten Analyten ausgesetzt war. Das Verfahren zum Analysieren des Haars der Person und keratinisierter Strukturen kann eine Aufzeichnung von Konsumierung oder Nicht-Konsumierung über sehr lange Zeiträume schaffen. Mutmaßungen hinsichtlich der wahren Bedeutung einer Blut- oder Urinanalyse werden nicht mehr benötigt werden. Die Sammlung von Haar ist weniger zudringlich und weniger körperlich abstoßend als die Sammlung von Blut- oder Urin und Proben können weder verändert oder ausgetauscht werden, noch kann man sich der Detektion durch kurzzeitige Enthaltung oder "Spülen" (übermäßige Einnahme von Flüssigkeit) vor einer angesetzten Untersuchung, wie z.B. Arbeitseinstellungstest oder jährliche Gesundheitsuntersuchung, entziehen. Proben können unbegrenzt ohne Einfrierung gelagert werden.

Die folgenden Beispiele veranschaulichen bestimmte Aspekte der Erfindung, begrenzen jedoch nicht die Erfindung, wie sie in der Beschreibung und den Patentansprüchen definiert ist.

Beispiel 1

Extraktion von Kokain aus Haarprobe

10 mg Haar wurden von einer Person entnommen, bei der der Verdacht bestand, daß sie kokainabhängig ist, und wurden durch Schütteln in Wasser bei 37°C 30 Minuten lang gewaschen. Zu 10 ml destilliertem Wasser wurden 110 mg Dithiothreitol (2,3-Dihydroxybutan-1,4-Dithiol, Cleland's Reagenz, erhalten von Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) hinzugegeben. Der pH-Wert der Lösung wurde mit 15%-tigem Kaliumhydroxid, das tropfenweise unter Rühren der DTT-Lösung hinzugegeben wurde, auf den pH-Wert 9,1 eingestellt. Das Rühren wurde fortgesetzt, während 80 Mikroliter einer Papainlösung vom Typ III (Papainase EC 3.4.22.2) (erhalten von Sigma Chemical Co., 16-40 BAEE-Einheiten-Aktivität pro mg Protein) hinzugegeben wurden. Die Enzymlösung hatte eine Konzentration von 30 mg Protein/ml Wasser, wobei 1 mg Enzymprotein eine Aktivität von 16-40 BAEE-Einheiten aufweist (eine BAEE-Einheit wird 1,0 Mikromol Natriumbenzoyl-L-Argininethylester bei einem pH-Wert von 6,2 bei 25°C hydrolysieren).

Zu 1 ml dieser Lösung wurden 10 mg Haarprobe in einem 13 x 75 mm Polykarbonat-Reagenzglas hinzugegeben. Die Lösung wurde in einem Wasserbad mit 37°C unter Schütteln 2 Stunden lang inkubiert und die Lösung wurde über Nacht bei 37°C ohne Schütteln stehengelassen. Die aufgelöste Haarprobe enthaltende Lösung wurde bei 2,000 U/min (Damon IEC Model CRU 5,000 Zentrifuge) zentrifugiert, um die Melaninkörnchen zu entfernen. Zu 1 cm³ der HaarabbauLösung wurden 200 Mi-

kroliter eines Phosphatpuffers von 1 Mol mit einem pH-Wert von 5,5 hinzugegeben.

100 Mikroliter dieser Lösung wurden durch RIA hinsichtlich des Vorliegens von Kokain (Benzoylecgonin-Äquivalent, oder "BEE") untersucht. Durch die RIA-Analyse wurden 83,6 Nanogramm BEE/10 mg Haar entdeckt.

Beispiel 2

Zugabe von Dithioerythritol

Die Haarprobe aus Beispiel 1 wurde unter Verwendung des in Beispiel 1 aufgeführten Abbau- und Assayverfahrens mit der Ausnahme analysiert, daß Dithiothreitol (DTT) durch Dithioerythritol (DTE) ersetzt wurde. Die Probe wurde durch RIA untersucht, wobei 82 Nanogramm Kokain (BEE) pro 10 mg Haar entdeckt wurden.

Beispiel 3

Zugabe von Kupfer(II)-sulfat

Nach Abbau der Haarprobe im Wasserbad für vier Stunden wurden 100 Mikroliter einer Kupfer(II)-sulfatlösung von 10 mg/ml zu 1 ml der wie in Beispiel 1 ausgeführt zubereiteten Haarabbaulösung hinzugegeben. Die Lösung wurde vor der Zugabe des Phosphatpuffers und der Untersuchung durch RIA bei 37°C 30 Minuten lang geschüttelt. Einhundert Mikroliter der Haarabbaulösung wurden durch RIA analysiert, wobei 85,0 Nanogramm Kokain(BEE)/10 mg Haar entdeckt wurden.

Beispiel 4

Zugabe von Natriumarsenit

Nach Abbau der Haarproben im Wasserbad für vier Stunden, wurden 100 Mikroliter einer Natriumarsenitlösung von 100 mg/ml zu 1,0 ml der wie in Beispiel 1 ausgeführt zubereiteten Haarabbau­lösung hinzugegeben. Die Lösung wurde bei 37°C 30 Minuten lang geschüttelt. 200 Mikroliter von 1M Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 6,5 wurde vor der Untersuchung durch RIA hinzugegeben. Einhundert Mikroliter der Haarabbau­lösung wurden durch RIA analysiert, wobei 82 Nanogramm Kokain (BEE) pro 10 mg Haar entdeckt wurden.

Beispiel 5

Substrataktivierung durch Dithiothreitol (DTT)

10 mg Haar wurde 11 mg DTT bei einem pH-Wert von 9,1 für eine Zeitspanne von 20 Stunden ausgesetzt. Die DTT-Lösung wurde entfernt und, wie in Beispiel 1, durch DTT und Papain ersetzt. Die Haarprobe löste sich innerhalb von 10 Minuten auf, verglichen mit einer Stunde für eine nicht mit DTT vorbehandelte und wie in Beispiel 1 abgebaute Kontrollprobe, wodurch gezeigt wurde, daß DTT nicht nur das sulfhydrylabhängige Enzym, Papain, sondern auch das Enzymsubstrat, Haar, aktiviert hat.

Beispiel 6

Abbau und Analyse von Haar unter Verwendung von Proteinase-K

10 mg Haar wurden von einer Person entnommen, bei der der Verdacht bestand, daß sie kokainabhängig ist, und durch Schütteln in Wasser bei 37 Grad Celsius 60 Minuten lang ge-

waschen. Zu 10 ml 0,05 M Tris-Puffer, pH-Wert 7,0, wurden 60 mg Dithiothreitol (DTT) und 20 mg Natriumdodecylsulfat (Laurylsulfat) hinzugegeben. Der pH-Wert der Lösung wurde überprüft, um sicherzustellen, daß die Lösung bei einem pH-Wert von 7,0 gepuffert wurde. Zu dieser Lösung wurden 0,5 mg Proteinase K (Protease Typ XI, von Tritirachium album, erhalten von Sigma Chemical Co.; 1 mg Enzymprotein hat eine Aktivität von 10-20 Einheiten; eine Einheit kann pro Minute Casein hydrolysieren, um Farbe zu erzeugen, die äquivalent 1,0 μ mol (181 μ g) Tyrosin ist, und zwar bei einem pH-Wert von 7,5 bei 37 Grad Celsius (Färbung durch Folin-Ciocalteu-Reagenz)).

Zu 1 ml dieser Lösung wurden 10 mg Haarprobe in ein 13 x 75 mm Polykarbonat-Reagenzglas gegeben. Die Lösung wurde in einem Wasserbad mit 37°C unter Schütteln 1 Stunde lang inkubiert und über Nacht bei 37°C ohne Schütteln stehengelassen. Die die aufgelöste Haarprobe enthaltende Lösung wurde zum Entfernen der Melaninkörnchen bei 2,000 U/min zentrifugiert. Zu 1 cm³ der HaarabbauLösung wurden 100 Mikroliter Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat (10 mg/ml) hinzugegeben und diese Lösung wurde bei 37°C 30 Minuten lang geschüttelt. Anschließend wurden 200 μ l eines 1M Phosphatpuffers mit einem pH-Wert von 7,0 hinzugegeben.

100 Mikroliter dieser Lösung wurden durch RIA hinsichtlich des Vorliegens von Kokain (Benzoylecgonin-Äquivalente, oder BEE) untersucht. Durch RIA-Analyse wurden 31,2 Nanogramm BEE/10 mg Haar entdeckt.

Beispiel 7

Rolle von Sulfhydryl-Verbindungen bei der Aktivierung von Haar für Abbau von Proteinase K

10 mg Haar wurden in einer Lösung inkubiert, die mit der in Beispiel 6 beschriebenen identisch war mit der Ausnahme, daß DTT weggelassen wurde. Während das Haar 24 Stunden lang dem Enzym ausgesetzt war, erfolgte kein Abbau von Haar, was die Notwendigkeit der Enzymaktivierung der Haarprobe durch den Substrataktivator DTT zeigt.

Beispiel 8

Auflösung von Fingernägeln

1 Eine 10 mg Probe von Fingernagelabschnitten wurde von einer Person erhalten und mit einem Reinigungsmittel gewaschen. 220 mg DTT wurden zu 10 ml Wasser in einem Reagenzglas hinzugegeben und der pH-Wert wurde, wie in Beispiel 1, auf 9,1 eingestellt. Eine Papain-Suspension, 160 Mikroliter, wurde dann hinzugegeben. 1,0 ml dieser Lösung wurden anschließend in einem Reagenzglas zu 10 mg Fingernagelabschnitten hinzugegeben und bei 37°C für eine Zeitspanne von 24 Stunden geschüttelt, bis die Auslösung erfolgte. Die Abbaulösung wurde dann, wie vorher beschreiben, durch RIA analysiert.

Beispiel 9

Durchführung von Abschnittsanalyse

Eine Haarprobe mit einer Länge von etwa 6 cm wurde von einer Person erhalten, bei der der Verdacht bestand, daß sie heroinabhängig ist. Die Proben wurden vorsichtig in drei Abschnitte von 2 cm geschnitten, wobei übereinstimmende Abschnitte in drei getrennte Reagenzgläser gegeben und gewaschen wurden. Die Haarproben wurden dem in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren mit der Ausnahme ausgesetzt, daß Chymopapain (EC 3.4.22.6) an Stelle von Papain als das Enzym verwendet wurde. Die Proben wurden über Nacht, wie vorher beschrieben, gerührt.

Durch RIA-Analyse wurde ein Morphinumgehalt in den drei Abschnitten von 13,5, 5,7 und 0 Nanogramm/10 mg Haar entdeckt.

Beispiel 10

Auflösung von abbauresistentem Haar

1 Zehn Milligramm Haar, das mit einem Entspannungsmittel behandelt wurde, wurde über Nacht in der in Beispiel 6 beschriebenen Abbaulösung inkubiert. Die Haarprobe löste sich in der gewöhnlichen Zeitspanne von 20 Stunden nicht auf. Eine größere und zusätzliche Menge Proteinase K, d.h. 1 mg, wurde anschließend zu der teilweise abgebauten Probe hinzugegeben. Die Probe löste sich dann innerhalb der nächsten 24 Stunden auf. Die Abbaulösung wurde zentrifugiert und 100 μ l CuSO_4 -Lösung (10 mg/ml) wurden zu 1 ml des Flüssigkeitsüberstand hinzugegeben, welcher dann bei 37 Grad Celcius 30 Minuten lang geschüttelt wurde. 200 μ l von 1M Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7 wurden hinzugegeben. Aufgrund der großen Menge Proteinase K in der resultierenden Abbaulösung, wurde vor der Untersuchung durch RIA 20 μ l des Proteinaseinhibitors Phenylmethylsulfonylchlorid in Ethanol zu der Abbaulösung hinzugegeben.

Durch RIA-Analyse wurden 7,4 ng Kokain (BEE)/10 mg Haar entdeckt.

Obwohl derzeit als bevorzugt angesehene Ausführungsformen der Erfindung beschrieben wurden, wird es für Fachleute offensichtlich sein, daß zahlreiche Abänderungen hinsichtlich der in den Ausführungsbeispielen aufgeführten Inhaltsstoffe, Bedingungen und Verhältnisse vorgenommen werden können, ohne von dem Umfang der Erfindung, wie in den anliegenden Patentansprüchen definiert, abzuweichen.

Ansprüche

1. Verfahren zum Detektieren und Identifizieren eines Analyten, der auf dem Weg der Nahrungsaufnahme in den Blutstrom einer Person eingetreten ist und sich in einer keratinisierten Struktur der Person eingelagert hat, mit den Schritten:

- (a) Herstellen einer Mischung aus einem für das Auflösen von Keratin geeigneten Proteaseenzym, einer Probe der keratinisierten Struktur und einem aus Dithiothreitol und Dithioerythritol ausgewählten Mittel;
- (b) Einwirkenlassen des Enzyms auf die Probe der keratinisierten Struktur, um diese unter Bildung einer Keratinabbaulösung abzubauen;
- (c) Verstreichenlassen einer ausreichenden Zeit für die Deaktivierung des Enzyms, falls erforderlich, und für die Deaktivierung des Mittels derart, daß das Enzym und das Mittel die Genauigkeit eines an der Abbaulösung durchgeführten Immunreaktionsverfahrens nicht beeinträchtigt, wobei die ausreichende Zeitspanne weniger als etwa 16 bis 20 Stunden beträgt; und
- (d) Analysieren eines Teils der Keratinabbaulösung durch ein Immunreaktionsverfahren zur Feststellung der Identität und Menge des Analyten, falls vorhanden, in der Probe der keratinisierten Struktur.

2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die Deaktivierung des Mittels bewirkt wird durch Zugabe eines zweiten, aus Kupfer und Arsenat ausgewählten Mittels zu der Lösung,

nachdem die keratinierte Struktur abgebaut wurde und bevor die Keratinabbau­lösung der Analyse unterzogen wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem die Analyse durch Radioimmunassay durchgeführt wird.

4. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, bei dem das Enzym aus Papain, Chymopapain und Proteinase K ausgewählt wird.

5. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, bei dem das Immunreaktionsverfahren akkurat durchgeführt werden kann innerhalb von etwa 4 bis 5 Stunden, nachdem die Keratinabbau­lösung hergestellt wurde.

6. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, bei dem das Keratin Haar ist.

7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, bei dem der pH-Wert der Abbau­lösung zwischen 7 und 9 liegt.

8. Verfahren zum Detektieren und Identifizieren eines Analyten, der auf dem Weg der Nahrungsaufnahme in den Blutstrom einer Person eingetreten ist und sich im Haar der Person eingelagert hat, mit den Schritten:

(a) Herstellen einer Mischung aus einem für die Auflösung von Haar geeigneten Proteaseenzym, einer Haarprobe und einem aus der Gruppe von Dithiothreitol und Dithioerythritol ausgewählten Mittel;

(b) Einwirkenlassen des Enzyms auf die Probe der keratinierten Struktur, um diese zur Bildung einer Haarabbau­lösung abzubauen;

(c) Hinzugabe von Kupfer zu der Haarabbau­lösung zum Deaktivieren des Mittels, nachdem die Haarprobe abgebaut wurde;

(d) Analysieren eines Teils der Haarabbaulösung durch ein Immunreaktionsverfahren zur Bestimmung der Identität und Menge des Analyten, falls vorhanden, in dem Haar.

9. Verwendung eines Verfahrens nach einem der vorangehenden Ansprüche zur Messung der Intensität und/oder Dauer der Aufnahme einer gesetzwidrigen Droge, eines Medikamentes oder einer toxischen Chemikalie durch eine Person.